

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
る事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 1 月 2 8 日
Date of Application:

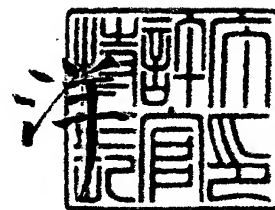
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 1 9 4 3 9
Application Number:
ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 0 1 9 4 3 9]

願 人 株 式 会 社 L T T バ イ オ フ ァ ー マ
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 2 月 2 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 8 3 4 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 LTT416
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 岡山県岡山市奥田西町 9 - 1 1 アンジェリーク奥田 2 0 2 号
 【氏名】 水島 徹
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都港区六本木 6 - 1 2 - 3 - 2 4 0 2
 【氏名】 水島 裕
【特許出願人】
 【識別番号】 303010452
 【氏名又は名称】 株式会社 L T T バイオファーマ
【代理人】
 【識別番号】 100083301
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 草間 攻
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053958
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0313604

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

蛍光色素カルセインを内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームを使用し、当該リポソームと試験化合物を反応させ、リポソームからのカルセインの漏出の程度を評価することを特徴とする、胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法。

【請求項 2】

カルセインの漏出の程度を、520 nm の蛍光を測定することにより行う請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】

細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジリンイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】

試験化合物が、抗炎症作用を有する化合物である請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】

抗炎症作用を有する化合物が、非ステロイド系抗炎症化合物またはステロイド系化合物である請求項 4 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】

請求項 4 または 5 に記載のスクリーニング方法で得られる胃粘膜に安全な抗炎症性化合物またはその塩。

【請求項 7】

胃粘膜傷害作用を有する化合物をスクリーニングするために使用する、蛍光色素カルセインを内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソーム。

【請求項 8】

細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジリンイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものである請求項 7 に記載のリポソーム。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症剤のスクリーニング方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、胃粘膜に対して安全である、いわゆる消化管障害の副作用が少ない化合物またはその塩、特に抗炎症化合物またはその塩を選択するスクリーニング方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

抗炎症薬のなかでも非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) は、優れた抗炎症作用を発揮する薬物であるが、消化管障害等の副作用が大きく、とくに胃潰瘍を誘発させる副作用が臨床の現場で大きな問題となっている。すなわち、現在において最も主要な胃潰瘍、胃炎の原因としては、非ステロイド系抗炎症薬 (NSAIDs) の使用があげられている。

しかしながらその一方で、高齢化社会の進展に伴い、NSAIDsの投与を必要とする患者も今後増え続けることが予想されることから、NSAIDsによる胃潰瘍の誘発を抑えた、胃粘膜傷害の副作用が無いNSAIDs、すなわち胃粘膜に安全なNSAIDsを開発することは、重要なことであるといえる。

【0003】

本発明者は、先にNSAIDsが有する胃潰瘍誘発の副作用の原因が、NSAIDsの直接細胞傷害性であることを発見し、直接細胞傷害性のないNSAIDsは、胃粘膜に対し安全で有用な薬になるという考え方を提案してきている (特許文献1)。

【特許文献1】 特開 2003-207507号公報

【0004】

すなわち、細胞膜でのシクロオキシゲナーゼを阻害し胃粘膜防御因子であるプロスタグランジンを減少させること、かつネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害活性を有する直接細胞傷害性のないNSAIDsが、胃潰瘍誘発等の副作用を有しない化合物であるとの考え方にに基づき、胃粘膜細胞傷害性と、胃粘膜でシクロオキシゲナーゼの阻害性の両者を指標にしたスクリーニング方法を提案してきている。

【0005】

本発明者は、その考え方をベースにさらに研究を重ねた結果、NSAIDsの直接細胞障害性の原因がNSAIDsの膜傷害性にあることを新規に見出し、さらに、その膜傷害性を簡便に検出し得る細胞膜モデルの作成に成功した。したがって、かかる細胞膜モデルを用いて、NSAIDsの膜傷害性の有無を判定することにより、胃粘膜に対して安全なNSAIDsを検索することが可能となる。

また、この細胞膜モデルを使用すれば、NSAIDsのみならず、胃粘膜に対して安全な薬物、すなわち胃粘膜傷害性のない化合物を広く検索することが可能となる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかして本発明は、胃粘膜に対して安全であり、消化管障害の副作用が少ない化合物またはその塩、とくに非ステロイド系抗炎症化合物またはその塩を選択するスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

かかる課題を解決するための本発明の基本的態様は、蛍光色素カルセインを内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームを使用し、当該リポソームと試験化合物を反応させ、リポソームからのカルセインの漏出の程度を評価することを特徴とする、胃粘膜に安全な化合物のスクリーニング方法である。

【0008】

具体的には、上記のカルセインの漏出の程度を、520nmの蛍光を測定することにより行うスクリーニング方法であり、また、細胞膜モデルとして使用するリン脂質が、フォ

スファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものであるスクリーニング方法である。

【0009】

より具体的には、本発明は、試験化合物が抗炎症作用を有する化合物、そのなかでも特に非ステロイド系抗炎症化合物またはステロイド系化合物であるスクリーニング方法であり、さらに本発明は、これらのスクリーニング方法で得られる胃粘膜に安全な抗炎症性化合物またはその塩を提供するものでもある。

【0010】

また本発明は、さらに別の態様として、胃粘膜傷害作用を有する化合物をスクリーニングするために使用する細胞モデルを提供するものであり、具体的には、胃粘膜傷害作用を有する化合物をスクリーニングするために使用する蛍光色素カルセインを内封するとともに、リン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームであり、より具体的には、細胞膜モデルとして使用するリン脂質がフォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミンまたはカルジオリピンから選択されるものであるリポソームを提供する。

【発明の効果】

【0011】

本発明が提供するスクリーニング方法は、簡便な細胞膜モデルを使用することにより、薬物の膜傷害性を検出することが可能となる。したがって、本発明が提供するスクリーニング方法を使用することにより、試験化合物の膜傷害性、特に非ステロイド系抗炎症作用を有する化合物（NSAIDs）の膜傷害性を簡単に測定することができ、その結果、胃粘膜に安全であり、胃粘膜障害の無い、臨床的に極めて有用なNSAIDsを開発し得る利点を有している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本発明で使用する細胞膜モデルとしては、細胞膜透過性を有する蛍光色素であるカルセイン（calcein）を内封したリポソームとして、リン脂質で構成されたリポソームを使用するものである。すなわち、NSAIDsの膜傷害性は、細胞膜の脂質部分における膜のバリア性を破壊することが主な作用であると考えられることから、リン脂質で構成されたリポソームを作成し、そのリポソームに蛍光色素であるカルセイン（calcein）を内封してやり、かかるリポソームとNSAIDsを反応させることにより、リポソームからのカルセインの漏出の程度を評価すれば、NSAIDsの膜傷害性の程度が判明できることとなる。

【0013】

なお、ここで使用するカルセインは、細胞傷害活性の測定に汎用されている蛍光色素であり、生細胞を染色し、細胞毒性の無い蛍光色素である。また、リポソーム膜を構成するリン脂質としては、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジルイノシトール、フォスファチジルエタノールアミン、カルジオリピン等を挙げることができる。これらのリン脂質は一種類を用いてリポソーム膜を構成してもよく、また複数種用いてリポソーム膜を構成してもよい。

【0014】

したがって、本発明はリン脂質から構成されるリポソーム膜に対し、試験化合物を反応させた場合におけるそのリポソーム膜の損傷程度の度合を測定することを手段とするものであり、言うなれば、胃粘膜を、リン脂質を使用したリポソーム膜に置き換えて試験しようとするものである。

したがって、胃粘膜とリン脂質を使用したリポソーム膜との間の相関性が存在するかどうかの一つの問題となる。本発明者の検討によれば、NSAIDsにおけるネクロシス/アポトーシスによる細胞生存率の低下でみた細胞傷害性と、リポソームモデルによる膜傷害性は良く一致していることが確認された。

【0015】

また、本発明者の検討によれば、NSAIDsの直接細胞傷害性の原因が、NSAIDsの膜傷害性にあることは以下の事実から証明された。すなわち、これまでに臨床的に使用されている10種類のNSAIDsに関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（ネクロシス／アポトーシスによる細胞生存率の低下でみた細胞傷害性）と、上記したリポソームモデルによる膜傷害性の程度を対比した。その結果、図1および2に示すように、その細胞傷害性と膜傷害性は極めて良く対応しており、直接細胞傷害の原因が、NSAIDsの膜傷害性に存在するものであることが確認された。すなわち、細胞傷害性の高いNSAIDsは、膜傷害性も高いものであり、細胞傷害性が弱いNSAIDsは、膜傷害性も弱いという対応が確認された（相関係数：0.91）。

【0016】

以上のように、本発明が提供する細胞膜モデルであるリポソームを使用する膜傷害性の判定により、NSAIDsの細胞傷害性を判定することができることとなる。ところで、本発明者は先に、胃潰瘍誘発の副作用の原因が、NSAIDsの直接細胞傷害性であることを見出し、直接細胞傷害性のない細胞膜モデルは、胃粘膜に安全であるという考え方を提唱している。そして、上記したように、この直接細胞傷害性の原因が、NSAIDsの膜傷害性にあるという事実からみれば、本発明が提供する細胞膜モデルを用いた膜傷害性の度合を測定することにより、胃粘膜に安全なNSAIDsをスクリーニングすることが可能となるのである。

【0017】

本発明が提供する細胞膜モデルを用いた、胃粘膜に安全なNSAIDsのスクリーニング方法は、具体的には以下のようにして行うことができる。すなわち、蛍光色素であるカルセインを内封するリン脂質から構成されるリポソームと、スクリーニングすべきNSAIDsを種々の濃度で反応させ、リポソームからのカルセインの漏出（すなわちリポソーム膜の傷害による漏出）の程度を、520nmの蛍光を測定することにより行うことができる。

【0018】

なお、上記したスクリーニング方法は、主にNSAIDsのスクリーニング方法であるが、本発明が提供するスクリーニング方法は、NSAIDsにのみ限定されず、胃粘膜に対して安全な薬物、すなわち胃粘膜障害性のない化合物を広くスクリーニングすることができることはいうまでもない。

【実施例】

【0019】

以下に本発明を、具体的実施例により説明する。

実施例1：カルセイン内封リポソームの作成

卵黄由来のフォスファチジルコリン（10 μ mol、7.7mg）を、クロロホルム／メタノール（1：2）混合液に溶解後、乾燥させた。その後1.5mLのジエチルエーテルに溶解させ、1mLの100mMカルセイン－水酸化ナトリウム含有水溶液（pH7.4）と混合した。次いでジエチルエーテルを除去し、カルセインを内封したリポソーム溶液を得た。

【0020】

実施例2：種々の公知のNSAIDsとの反応によるリポソームからのカルセインの漏出

NSAIDsとして、臨床的に使用されている公知のインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ジクロフェナック、フルルビプロフェン、メフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドを選択し、上記実施例1で得たリポソーム溶液中に種々の濃度で添加し、30℃にて10分間反応させた。反応液の520nmの蛍光を測定することにより、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害）を測定した。

その結果を、図3（インドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ジクロフェナックおよびフルルビプロフェンについての結果）および図4（メフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドについての結果）にまとめて示した。

【0021】

図3に示したNSAIDsであるインドメタシン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ジクロフェナックおよびフルルビプロフェンについては、胃粘膜細胞傷害性の強さは、インドメタ

シン>ジクロフェナック>フルルビプロフェン>イブプロフェン>ケトプロフェンの順であるとされている。リポソームからのカルセインの漏出の程度もその順であり、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害性）の程度を評価することにより、胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症化合物の評価ができていることが良く理解された。

【0022】

また、図4に示したNSAIDsであるメフェナム酸、フルフェナム酸、セレコキシブ、エトドラクおよびニメスリドについては、胃粘膜細胞傷害性の強さは、セレコキシブ>メフェナム酸>フルフェナム酸>ニメスリド>エトドラクの順であるとされている。リポソームからのカルセインの漏出の程度もその順であり、図3に示した結果と同様に、リポソームからのカルセインの漏出（膜傷害性）の程度を評価することにより、胃粘膜に安全な非ステロイド系抗炎症化合物の評価ができていることが良く理解された。

【産業上の利用可能性】

【0023】

以上記載のように、本発明により、極めて簡便な細胞膜モデルを使用することにより、試験化合物、特に非ステロイド系抗炎症作用を有する化合物（NSAIDs）の膜傷害性を検出することが可能となる。したがって、本発明のスクリーニング方法を使用することにより、NSAIDsの膜傷害性を簡単に測定することができることから、胃粘膜に安全な、胃粘膜傷害の無い、臨床的に極めて有用なNSAIDsをはじめとする化合物を開発し得る利点を有している。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】 10種類のNSAIDsに関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（ネクロシス）と、本発明のリポソームモデルによる膜傷害性の相関関係を示す図である。

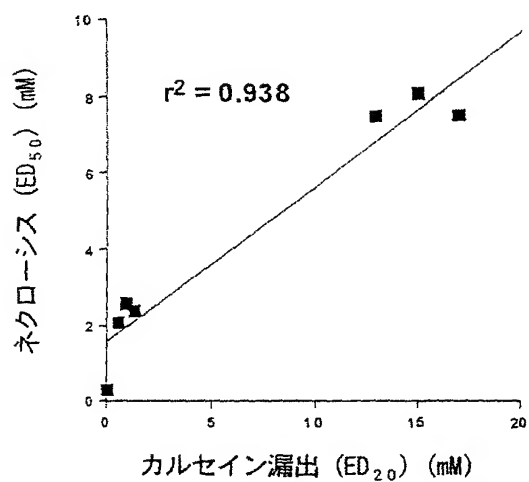
【図2】 10種類のNSAIDsに関して、その細胞生存率の低下で見た細胞傷害性（アポトーシス）と、本発明のリポソームモデルによる膜傷害性の相関関係を示す図である。

【図3】 本発明の実施例2の結果について、その一部を示す図である。

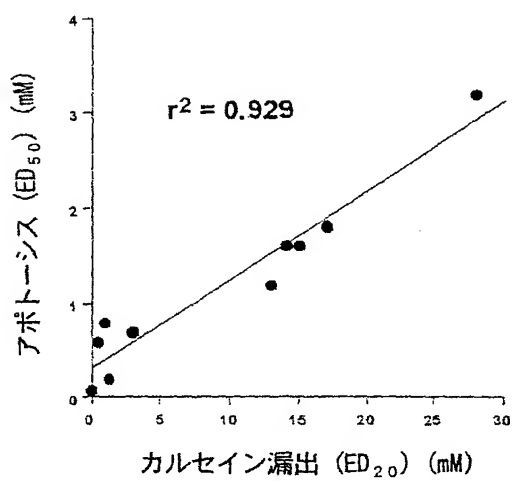
【図4】 本発明の実施例2の結果について、その一部を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】

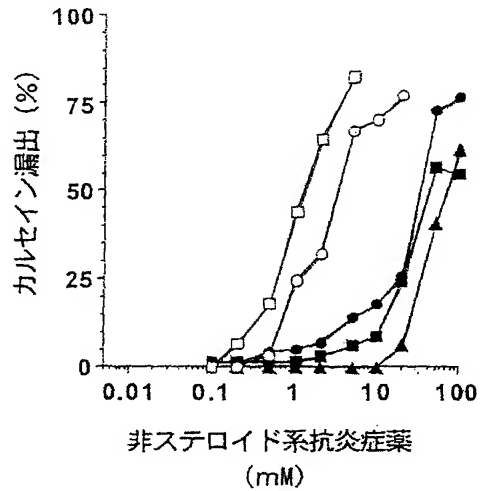


【図 2】



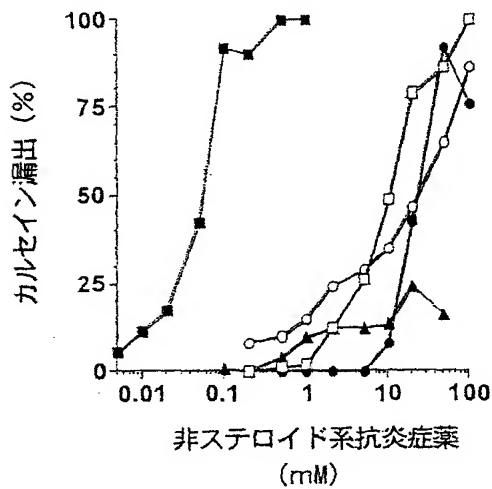
【図 3】

- インドメタシン ○— ジクロフェナク
 ■— イブプロフェン ●— フルルビプロフェン
 ▲— ケトプロフェン



【図 4】

- メフェナム酸 ○— フルフェナム酸
 ■— セレコキシブ ●— ニメスリド
 ▲— エトドラク



【書類名】要約書**【要約】****【課題】**

胃粘膜に対して安全であり、消化管傷害の副作用が少ない化合物またはその塩、とくに非ステロイド系抗炎症化合物またはその塩を選択するスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】

蛍光色素であるカルセインを内封するとともに、フォスファチジルコリン、フォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、フォスファチジイノシトール等のリン脂質で構成された細胞膜モデルを有するリポソームを使用し、当該リポソームと試験化合物を反応させ、リポソームからのカルセインの漏出の程度を評価することを特徴とする、胃粘膜に安全な化合物、特に非ステロイド系抗炎症化合物のスクリーニング方法である。

【選択図】

図 4

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2004-019439
受付番号	50400138023
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成16年 1月29日

<認定情報・付加情報>

【提出日】

平成16年 1月28日

特願 2004-019439

出願人履歴情報

識別番号

[303010452]

1. 変更年月日
[変更理由]

住所
氏名

2003年 2月25日
新規登録
東京都港区愛宕2丁目5番1号
株式会社LTTバイオフィーマ